

Desafios da Ciência e Tecnologia de Alimentos 2

Damaris Beraldi Godoy Leite
Antonio Carlos Frasson
(Organizadores)





DESAFIOS DA CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS 2

**Damaris Beraldi Godoy Leite
Antonio Carlos Frasson
(Organizadores)**

Editora Chefe

Profª Drª Antonella Carvalho de Oliveira

Conselho Editorial

Prof. Dr. Antonio Isidro-Filho
Universidade de Brasília

Prof. Dr. Valdemar Antonio Paffaro Junior
Universidade Federal de Alfenas

Prof. Dr. Álvaro Augusto de Borba Barreto
Universidade Federal de Pelotas

Profª Drª Deusilene Souza Vieira Dall'Acqua
Universidade Federal de Rondônia

Prof. Dr. Antonio Carlos Frasson
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Prof. Dr. Constantino Ribeiro de Oliveira Junior
Universidade Estadual de Ponta Grossa

Profª Drª Lina Maria Gonçalves
Universidade Federal do Tocantins

Prof. Dr. Takeshy Tachizawa
Faculdade de Campo Limpo Paulista

Profª Drª Ivone Goulart Lopes
Istituto Internazionale delle Figlie de Maria Ausiliatrice

Prof. Dr. Carlos Javier Mosquera Suárez
Universidad Distrital Francisco José de Caldas/Bogotá-Colombia

Prof. Dr. Gilmei Francisco Fleck
Universidade Estadual do Oeste do Paraná

2017 by Damaris Beraldi Godoy Leite e Antonio Carlos Frasson

© Direitos de Publicação

ATENA EDITORA

Avenida Marechal Floriano Peixoto, 8430

81.650-010, Curitiba, PR

contato@atenaeditora.com.br

www.atenaeditora.com.br

Revisão
Os autores

Edição de Arte
Geraldo Alves

Ilustração de Capa
Geraldo Alves

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
(eDOC BRASIL, Belo Horizonte/MG)

D441

Desafios da ciência e tecnologia de alimentos 2 / Organizadores
Damaris Beraldi Godoy Leite, Antonio Carlos Frasson. – Curitiba
(PR): Atena, 2017. – (Desafios da Ciência e Tecnologia de
Alimentos ; v. 2)
221 p. : il. ; 592 kbytes

Formato: PDF

ISBN: 978-85-93243-18-9

DOI: 10.22533/at.ed.1890903

Inclui bibliografia.

1. Alimentos - Análise. 2. Alimentos - Indústria. 3. Tecnologia de
alimentos. I. Leite, Damaris Beraldi Godoy. II. Frasson, Antonio
Carlos. III. Título.

CDD-664.07

O conteúdo dos artigos e seus dados em sua forma, correção e confiabilidade são de responsabilidade exclusiva dos seus respectivos autores.

Agência Brasileira do ISBN

ISBN 978-85-93243-18-9



Apresentação

A saúde é um completo estado de bem-estar, físico, mental e social, e não apenas a ausência de doenças, ingerir alimentos seguros e nutritivos é parte do processo de saúde do ser humano e para alcançar esses objetivos necessita-se do controle de qualidade.

Ao discorrer sobre o controle de qualidade Germano e Germano (2008) comentam que o controle alimentar é eficaz na medida que possui o apoio da população e da opinião pública, pois a educação deve preceder a lei, pois ela, por si só, não melhora a qualidade dos alimentos.

Para que esse controle seja plenamente atingido, juntamente com o incremento da legislação, devem-se aprimorar os procedimentos de laboratório para avaliação do produto em todas as fases do processo, a fim de garantir o controle higiênico-sanitário dos alimentos.

Dentro do território nacional o consumidor possui o Código de Defesa do Consumidor, Lei n. 8.078/90, um poderoso instrumento para que o cidadão possa se resguardar dos maus serviços e garantir os mesmos direitos básicos em relação a saúde e a segurança, bem como possui o suporte da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), agência reguladora que exerce o controle sanitário sobre alimentos, regulamentada sob a Lei nº. 9.782, de 26/01/99.

No que concerne a segurança alimentar e ao controle de qualidade, o país dispõe de mecanismos próprios de fiscalização e controle, para que o alimento tenha o mais rígido controle de qualidade, estimulando estudos aprofundados nessa área, pois esse tema é profícuo em desafios.

Caro leitor, nesse volume você encontrará 17 artigos que discorrem sobre o Controle de Qualidade, especificamente relacionados aos alimentos e seus subprodutos das mais variadas regiões do Brasil, o que nos leva a pergunta inicial: O que é Controle de Qualidade?

Certamente existem muitas respostas para essa pergunta, mas ao ler esse *e-book* você certamente, poderá vislumbrar essa resposta por meio do olhar de seus autores que o fizeram com análises centesimais, químicas, físicas, microbiológicas, contagem de bactérias, estudo de peptídeos, avaliação de rótulos, potencial antioxidante e nutricional.

Ao usarem métodos diversos para alcançarem objetivos variados, com o intuito de garantir a qualidade final dos diferentes produtos apresentados no *e-book*, foram realizados testes em diferentes momentos da vida de prateleira do produto, o que propiciou visões diversas sobre o comportamento desses ingredientes e/ou produtos, demonstrando a criatividade e precisão dos autores.

Apreciem a leitura e atentem-se para os achados na avaliação físico-química de produtos diferenciados, as novidades dos compostos antioxidantes, o incremento no portfólio de produtos inovadores e subprodutos anteriormente

descartados, demonstrando a visão de um mundo sustentável onde as culturas são respeitadas e o material biológico é visto em sua integralidade.

Desejamos a todos uma boa leitura e enriquecimento com o estudo dos textos!

Damaris Beraldi Godoy Leite

Antonio Carlos Frasson

Sumário

Apresentação.....	04
-------------------	----

Eixo temático: Controle de qualidade

Capítulo I

CENTESIMAL ANALYSIS OF PROTEIN CONTENT IN WHEY PROTEIC SUPPLEMENTS

Matheus Lemos Silva, Maria Lúcia Costa, Tayná Gomes Dantas Silva, Renata Ferreira Santana, Adriana da Silva Miranda e Erlânia do Carmo Freitas.....

09

Capítulo II

PROXIMATE COMPOSITION AND MINERAL CONTENT OF STRAWBERRY COPRODUCTS

Erlânia do Carmo Freitas, Adriana da Silva Miranda, Renata Ferreira Santana, Alessandra Braga Ribeiro, Marcondes Viana da Silva e Hanna Elisia Araújo de Barros.....

18

Capítulo III

FITOQUÍMICOS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE EXTRATOS DE PRÓPOLIS

Cristina Jansen, Suzane Rickes Luz, Tailise Beatriz Roll Zimmer, Karina Ferreira Fernandes, Eliezer Avila Gandra e Rui Carlos Zambiasi.....

29

Capítulo IV

THE QUALITY OF INDUSTRIAL AND HOMEMADE COCONUT OIL (EXTRA VIRGIN) SOLD IN VITÓRIA DA CONQUISTA-BA

Adriana da Silva Miranda, Jamille Nunes Pereira, Renata Ferreira Santana, Fábio Pereira de Souza, Erlânia do Carmo Freitas e Maria Helena Santos Oliveira.....

46

Capítulo V

PHYSICAL-CHEMICAL AND MICROBIOLOGICAL CHARACTERIZATION OF THE TAMALES PRODUCED IN THE SOUTH OF VITÓRIA DA CONQUISTA – BAHIA

Matheus Lemos Silva, Iolanda Almeida Santos, Juliana Rocha Francisco, Renata Ferreira Santana, Erlania do Carmo Freitas e Adriana da Silva Miranda.....

55

Capítulo VI

CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DA FARINHA DE JENIPAPO (*Genipa americana* L.): CURVA DE SECAGEM E ESTABILIDADE DOS CAROTENOIDES TOTAIS

Jéssica Souza Ribeiro, Guilherme Augusto Viana Andrade, Larissa Bello Donato, Náthila Qéssia dos Santos Lôbo, Daniel Mario Tapia Tapia, Cassiara Camelo de Souza, Márcia Elena Zanuto e Marcondes Viana da Silva.....64

Capítulo VII

EFEITOS DA GERMINAÇÃO NA COMPOSIÇÃO NUTRICIONAL DE FEIJÃO AZUKI

Bianca Pio Ávila, Reni Rockenbach, Jander Luis Fernandes Monks e William Peres, Marcia Arocha Gularte e Moacir Cardoso Elias.....74

Capítulo VIII

AVALIAÇÃO DA CONFORMIDADE E DA COMPOSIÇÃO DE SUPLEMENTOS ALIMENTARES PROTEICOS

Karen Rodrigues Oliveira da Conceição, Christiano Vieira Pires, Vinicius Lopes Lessa e Kelly de Freitas Maro.....84

Capítulo IX

AVALIAÇÃO DA ROTULAGEM DE BEBIDAS LÁCTEAS UHT COMERCIALIZADAS EM SUPERMERCADOS DE FORTALEZA/CE

Maria Jaiana Gomes Ferreira, Lívia Gabrielle Maciel Sales, Luanda Rêgo de Lima e Juliane Döering Gasparin Carvalho.....92

Capítulo X

CONTAGEM DE BACTÉRIAS ÁCIDO-LÁCTICAS TOTAIS EM IOGURTES PROBIÓTICOS PRODUZIDOS NO ESTADO DE PERNAMBUCO

Graciliane Nobre da Cruz Ximenes, Neide Kazue Sakugawa Shinohara, Márcia Monteiro dos Santos, Jenyffer Medeiros Campos e Neila Mello dos Santos Cortez.....101

Capítulo XI

DIFERENCIAÇÃO DE CAROTENOIDES TOTAIS EM CULTIVARES COMUNS, ORGÂNICAS DE BATATA DOCE DE POLPA LARANJA

Lucia Maria Jaeger de Carvalho, Claudia de Lucas Baganha e José Luiz Viana de Carvalho.....114

Capítulo XII

POTENCIAL ANTIOXIDANTE E QUELANTE DE PEPTÍDEOS DE OCORRÊNCIA NATURAL DE FEIJÃO COMUM (*P. vulgaris*)

Ladyslène Christhyns de Paula, Erika Valencia Mejía, Bruna Rodrigues Moreira Karla de Aleluia Batista e Katia Flávia Fernandes.....127

Capítulo XIII

ESTUDO DE PEPTÍDEOS BIOATIVOS EXTRAÍDOS DO FEIJÃO COMUM (*P. VULGARIS*) CULTIVAR PÉROLA

Juliana Vila Verde Ribeiro, Karla de Aleluia Batista, Ladyslène Christhyns De Paula e Katia Flávia Fernandes.....148

Capítulo XIV

ESTUDO DO POTENCIAL NUTRICIONAL DE BEBIDAS LÁCTEAS COM FRUTOS DO CERRADO

Fabiane Neves Silva, Larissa Bessa Fernandes, Grazielle Layanne Mendes Santos, Raquel Borges Faria, Carla Adriana Ferreira Durães e Igor Viana Brandi.....166

Capítulo XV

REDUÇÃO DO TAMANHO DE PARTÍCULA DE FARINHA DE GRÃO INTEIRO E ALTERAÇÕES NAS PROPRIEDADES DE PASTA

Josemere Both, Joseane Bressiani, Tatiana Oro, Isadora Strapazon, Gabriela Soster Santetti e Luiz Carlos Gutkoski.....173

Capítulo XVI

APORTE DE COMPOSTOS ANTIOXIDANTES PELO CONSUMO DE FRUTAS DESIDRATADAS

Larissa Chivanski Lopes, Armando Troina da Silva, Kelly Cristina Massarolo, Naralice Hartwing, Larine Kupski e Eliana Badiale Furlong.....184

Capítulo XVII

COMPOSIÇÃO CENTESIMAL E MINERAL DE COPRODUTOS DO CUPUAÇU
Marcondes Viana da Silva, Erlânia do Carmo Freitas, Renata Ferreira Santana, Adriana da Silva Miranda, Alessandra Braga Ribeiro e Jonathan Jardim Oliveira.....193

Capítulo XVIII

AVALIAÇÃO SENSORIAL DE PÃES DE FORMA COM ADIÇÃO DE FARINHA INTEGRAL E FERMENTO NATURAL LIOFILIZADO

Raquel Facco Stefanello, Amanda Aimée Rosito Machado, Cristiano Ragagnin. Menezes e Leadir Lucy Martins Fries.....206

Sobre os organizadores.....221

Sobre os autores.....222

POTENCIAL ANTIOXIDANTE E QUELANTE DE PEPTÍDEOS DE OCORRÊNCIA NATURAL DE FEIJÃO COMUM (*P. vulgaris*)

**Ladyslène Christhyns de Paula
Erika Valencia Mejía
Bruna Rodrigues Moreira
Karla de Aleluia Batista
Katia Flávia Fernandes**

POTENCIAL ANTIOXIDANTE E QUELANTE DE PEPTÍDEOS DE OCORRÊNCIA NATURAL DE FEIJÃO COMUM (*P. vulgaris*)

Ladyslene Christhyns de Paula

Universidade Federal de Goiás, Laboratório de Química de Polímeros
Goiânia – Goiás

Erika Valencia Mejía

Universidade Federal de Goiás, Laboratório de Química de Polímeros
Goiânia – Goiás

Bruna Rodrigues Moreira

Universidade Federal de Goiás, Laboratório de Química de Polímeros
Goiânia – Goiás

Karla de Aleluia Batista

Instituto Federal de Ciência Tecnologia de Goiás, Campus Goiânia Oeste
Goiânia – Goiás

Katia Flávia Fernandes

Universidade Federal de Goiás, Laboratório de Química de Polímeros
Goiânia – Goiás

RESUMO: Neste trabalho foram avaliadas as propriedades antioxidantes e quelante do metal Fe^{2+} de peptídeos de ocorrência natural, utilizando grãos de feijão recém colhidos (ETC) e endurecidos (HTC). Os resultados evidenciaram que o método 2 é mais eficaz na extração de peptídeos e polipeptídeos, devido as características químicas do solvente. Em relação a atividade antioxidante pelo método DPPH, foi observado diferença estatística entre a atividade do extrato bruto e as amostras submetidas ao fracionamento, ocorrendo ainda incremento da atividade antioxidante nas farinhas ETC. Em relação ao ensaio de FRAP, observa-se elevada atividade antioxidante para as amostras submetidas ao fracionamento, sendo até 5,4 vezes superior que a dos extratos brutos. Na atividade quelante de Fe^{2+} , a maior atividade foi obtida na fração < 10 kDa, comprovando que esta atividade é promovida por peptídeos e polipeptídeos com menos de 100 aminoácidos.

PALAVRAS-CHAVE: compostos bioativos, peptídeos, antioxidante, quelante de metais.

1.INTRODUÇÃO

O feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) destaca-se como uma das principais culturas do país, tendo ampla distribuição geográfica e colheita em três safras anuais. O feijão é a principal leguminosa da alimentação humana. Ele supre grande parte das necessidades proteicas diárias dos indivíduos, uma vez que 20% a 30% da massa seca das sementes é constituída por proteínas. Além disso, a composição de aminoácidos das proteínas de feijão permite que esta

leguminosa substitua as de origem animal a um preço mais acessível, fator especialmente importante para as frações menos favorecidas da população (RICHETTI et al., 2011).

O papel das proteínas como componentes fisiologicamente ativos na dieta é amplamente reconhecido. Além disso, as proteínas têm regiões dentro da molécula que ao serem liberados no processo de digestão, executam funções biológicas importantes para o organismo. Estes fragmentos são denominados peptídeos e podem ter um efeito nas funções ou condições do corpo humano, afetando positivamente a saúde (LEMES et al., 2016).

Existem dois tipos de peptídeos bioativos, os peptídeos nativos e os chamados peptídeos encriptados. Os peptídeos nativos são aqueles que estão naturalmente presentes na matéria-prima alimentícia, cumprindo funções metabólicas ou defesa para a planta. Os peptídeos encriptados correspondem àqueles que estão presentes na estrutura primária da proteína mas só desempenham sua atividade biológica após sua liberação da sequência protéica.

De todos os possíveis métodos para a obtenção de peptídeos bioativos, a hidrólise enzimática é o método mais comum de produção para as indústrias de alimentos e farmacêutica (BROADHURST et al., 2017; MARCOS et al., 2015; ROCHA et al., 2014). A hidrólise enzimática pode ocorrer tanto pela utilização de enzimas digestivas quanto pela utilização de enzimas provenientes de bactérias ou fungos e fragmentam os chamados peptídeos encriptados. No entanto, relatos na literatura indicam potencial atividade biológica de peptídeos nativos ainda pouco explorados, extraídos de fontes vegetais (AWIKA e DUODU, 2016; RIZZELO et al., 2016), o que representa uma perspectiva de obtenção de peptídeos e proteínas pequenas que apresentem o mesmo potencial de hidrolisadas, porém com uma redução nos custos do processo e também no tempo de processamento.

Os peptídeos bioativos, podem atuar nos sistemas cardiovascular (ações anti-hipertensiva, antioxidante, antitrombótica e hipocolesterolemiantes), nervoso (atividades opióides – agonista e antagonista), gastrointestinal (funções quelante de minerais, inibidor de apetite e antimicrobiana) e imunológico (ações antimicrobiana, imunomodulatória e citomodulatória) dependendo da sequência de aminoácidos presentes na estrutura da molécula (HARTMANN e MEISEL, 2007; KORHONEN e PIHLANTO, 2006).

Sabendo-se da importância dos peptídeos bioativos para a promoção da saúde humana, diversos estudos relatam a importância de peptídeos de feijão produzidos por hidrólise enzimática (**ARIZA-ORTEGA et al., 2014; BETANCUR-ANCONA et al., 2014; CÂMARA et al., 2013; CARRASCO-CASTILLA et al., 2012**). No entanto, ainda não há relatos na literatura sobre peptídeos de ocorrência natural em feijões comuns (*Phaseolus vulgaris*), sendo, portanto, uma abordagem que se faz necessária, por se tratar de uma leguminosa amplamente consumida no cenário mundial.

Atualmente, o Brasil é o maior produtor e consumidor mundial de feijão

comum, seguido pela Índia, China e México, com produção estimada em 3.334,6 mil toneladas na safra 2015/2016, em uma área de 3 milhões de hectares (CONAB, 2016).

Sabe-se que os feijões cariocas são os mais consumidos pela população brasileira, daí a importância de a qualidade dos grãos armazenados ser semelhante à dos grãos de colheita recente, uma vez que esta é uma das características que afetam a aceitação das cultivares do feijão tipo carioca pela população (SIQUEIRA et al., 2014).

No entanto, durante o período de armazenamento, o feijão passa por modificações fisiológicas e bioquímicas que podem alterar sua qualidade, tanto para o uso como semente, como para o consumo como alimento. As alterações mais visíveis durante o armazenamento do feijão são escurecimento da casca e resistência ao amaciamento por cocção (LIMA, 2013).

Acredita-se que reações complexas sejam desencadeadas no interior dos grãos, durante períodos prolongados de armazenamento. Inúmeras alterações, envolvendo enzimas, membrana, parede celular e materiais de reserva, como amido e proteínas, dão início ao processo de endurecimento conhecido como *hard-to-cook* (HTC) ou “difícil de cozinhar” (NASAR-ABBAS et al., 2008; RIBEIRO et al., 2007), que pode afetar a digestibilidade dos grãos e sua hidrólise (BATISTA et al., 2011; SIQUEIRA et al., 2014).

Este fenômeno é responsável por perdas anuais expressivas. Estima-se que, por ano, 100-500 mil toneladas de feijão deixam de ser utilizados na alimentação humana em função do endurecimento (LOPES et al., 2012).

A provável complexação de proteínas e carboidratos com outros constituintes da semente resulta em uma redução considerável do potencial de aproveitamento dos nutrientes presentes no grão, uma vez que essas biomoléculas não conseguem ser completamente hidrolisadas no processo de digestão, ocorrendo, conseqüentemente, uma redução da biodisponibilidade destes compostos (BATISTA; PRUDENCIO; FERNANDES, 2010).

Assim, o presente estudo, tem como objetivo determinar a atividade antioxidante e quelante de peptídeos de ocorrência natural em feijão comum (*Phaseolus vulgaris*) por meio de diferentes métodos de extração, utilizando grãos de feijão recém colhidos (ETC) e endurecidos (HTC).

2.METODOLOGIA

Material Vegetal

Para a realização deste trabalho foram utilizados grãos de feijão comum (*Phaseolus vulgaris*), grupo comercial carioca, cultivar BRS Pontal, cultivados no Centro Nacional de Pesquisa Arroz e Feijão, CNPAF-EMBRAPA. Os grãos controles (ETC) foram armazenados em freezer logo após a colheita, para preservação de suas propriedades físico-químicas e tecnológicas, enquanto

que os grãos HTC foram endurecidos segundo metodologia descrita por Ribeiro et al. (2009). Para promover o fenômeno HTC, os grãos foram armazenados por 4 meses em estufa BOD à temperatura de 40 °C e umidade relativa entre 70-75%.

Preparo das farinhas

Os grãos de feijão comum (*Phaseolus vulgaris*, cv BRS Pontal) recém colhidos (ETC) e endurecidos (HTC), foram triturados em moinho de facas, peneirados em tamiz de 35 *mesh* (0,425 mm), acondicionados em sacos de polietileno e armazenados sob refrigeração (4 °C) até o momento de sua utilização.

Métodos de extração

As metodologias de extração foram conduzidas segundo descrito por Mahatmanto et al. (2014) e Oseguera-Toledo et al. (2011), com modificações.

Método 1: Diclorometano/Metanol

Para a extração utilizando-se diclorometano (DCM) e metanol (MeOH) (1:1), 1g de farinha de feijão foi solubilizada em 5mL do solvente e colocados sob agitação, durante 1h à temperatura ambiente. O extrato produzido foi centrifugado a 4000 rpm durante 5 min e o sobrenadante coletado e colocado em concentrador a vácuo (Concentrador Plus 5305, Eppendorf®) para evaporação do solvente. A solução livre de solventes orgânicos foi congelada a -80°C e liofilizada (Liofilizador L101, LIOBRAS).

Método 2: Acetonitrila/Água/Ácido fórmico (25:24:1)

Foi realizada extração com acetonitrila (ACN), água e ácido fórmico (AF) (25:24:1), utilizando-se 5 mL de solvente para cada 1g de farinha. A mistura foi agitada durante 1h à temperatura ambiente. Em seguida o extrato foi centrifugado a 4000 rpm, durante 5 minutos. O sobrenadante foi coletado e colocado em concentrador a vácuo (Concentrador Plus 5305, Eppendorf®) para completa evaporação da acetonitrila. O extrato resultante foi congelado (-80 °C) e liofilizado.

Método 3: Acetato de sódio

A 1g de amostra foi adicionado a 5 mL do solvente acetato de sódio 20mM pH 5,0, e agitados, durante 1h a 4°C. O extrato foi centrifugado por 5 minutos a 4000 rpm a 4°C e o sobrenadante coletado e armazenado em freezer -80°C, para posterior liofilização.

Método 4: Bicarbonato de amônio

Para a extração, 5mL do solvente bicarbonato de amônio 5mM, pH 8,0, foram adicionados a 1g de amostra e agitados durante 1h à temperatura ambiente. O extrato foi centrifugado a 4000 rpm durante 5min e armazenado a -80°C. O material foi liofilizado antes da realização dos testes de atividade biológica.

Método 5: Extração alcalina (pH 8,0)

A 1g de amostra foi adicionada 5mL de água e o pH da solução ajustado para pH 8,0 com NaOH 0,2M. A solução foi agitada em agitador durante 1h à temperatura ambiente e em seguida centrifugada a 4000 rpm durante 5min. O sobrenadante foi coletado e armazenado em freezer -80°C, sendo liofilizado em seguida.

Quantificação de proteínas

A determinação da quantidade de proteínas nas amostras foi realizada utilizando-se o kit Qubit® fluorometer. Para o ensaio adicionou-se entre 2-20µL de amostra juntamente com 180-198µL da solução de trabalho (1µL do reagente de cor, 199µL de tampão) em microtubos de 200µL, como recomendado pelo fabricante do kit. Os tubos foram incubados durante 15 min à temperatura ambiente e em seguida, lidos no aparelho. O resultado final da dosagem foi expresso em µg de proteína por mL de amostra.

Eletroforese

O perfil eletroforético das frações proteicas extraídas foi avaliado de acordo com metodologia descrita por Laemmli (1970), usando gel de corrida preparado com poliacrilamida 15% (p/v) e gel concentrador de poliacrilamida 5% (p/v). As amostras foram solubilizadas em tampão de amostra (25mM de Tris-HCl, pH 6,8, 2% (p/v) de dodecil sulfato de sódio (SDS), 20% (v/v) de glicerol, 5% (p/v) de β-mercaptoetanol, 0,025% (p/v) de azul de bromofenol). As amostras foram fervidas por 5 min e aplicadas no gel imerso em uma cuba de eletroforese contendo tampão de corrida (250 mM de Tris-base, 1,92 M de glicina e 1% (p/v) de SDS). A eletroforese foi realizada mantendo-se amperagem fixa 40mA, e os géis foram corados com solução de Comassie Blue (R250) 0,1 % (p/v) por 30min e descorados em solução descolorante (40% v/v metanol, 10% ácido acético v/v, 50% v/v água destilada).

Separação das frações por ultrafiltração

Os extratos foram fracionados por massa molecular utilizando-se uma unidade de ultrafiltração (Millipore Corporation, Billerica, MA) de acordo metodologia descrita por Oseguera-Toledo et al. (2015). As frações foram separadas pela passagem forçada por gás nitrogênio por meio de uma membrana Ultracel® de 10kDa, sendo a fração retida e eluída (fração < 10kDa) coletadas separadamente. As diferentes frações foram armazenadas em freezer -80°C para posterior liofilização e avaliação de suas atividades biológicas.

Ensaio com o Radical Livre DPPH

A atividade antioxidante foi determinada por meio da redução do radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) pelos antioxidantes presentes na amostra, método proposto por Brand-Williams et al., 1995, com modificações (ZHAO et al., 2014). Foi realizado uma curva de calibração feita com um antioxidante de referência, Trolox (6-Hidroxi-2,5,7,8-tetrametilchroman-2-ácido carboxílico), a 2mM, em diferentes concentrações.

As determinações foram realizadas utilizando-se microplaca de poliestireno com 96 cavidades. Em cada cavidade foram adicionados 200 µL da solução de DPPH, 50 µL de metanol para o grupo controle, o mesmo volume para a solução-padrão de Trolox e para os extratos obtidos das amostras, adequadamente diluídos, quando necessário. As misturas foram deixadas a temperatura ambiente por 15 min e as leituras de absorbância foram realizadas a 515 nm, utilizando-se espectrofotômetro de microplaca Epoch (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA).

A atividade antioxidante foi determinada pela interpolação dos dados de absorbância com os valores obtidos em curva de calibração com linearidade entre 0-300 mM de Trolox. Os resultados foram expressos em TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity), que é definido como a concentração do antioxidante (mg de proteína) que fornece a mesma percentagem de inibição do Trolox (mM) (RE e tal, 1999).

Ensaio Método FRAP

A determinação da atividade antioxidante pelo método de FRAP (**Ferric Reducing Antioxidant Power**) foi realizada utilizando-se a metodologia descrita por Benzie e Strain (1996), com modificações.

Para o preparo do reagente FRAP, misturou-se 25 mL de tampão acetato de sódio 0,3 M (pH 3,6), 2,5 mL de uma solução 10 mM de TPTZ

(2,4,6-Tris(2-piridil)-s-triazina) preparada com HCl 40 mM, e 2,5 mL de uma solução aquosa de cloreto férrico 20 mM.

Alíquotas de 50 µL de amostra foram misturadas com 150 µL de água e 1,3 mL do reagente FRAP recém-preparado. Esta mistura foi homogeneizada e mantida em banho-maria à 37°C. Decorridos 30 minutos, foi realizada a leitura a 595 nm em espectrofotômetro de microplaca Epoch (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) a temperatura ambiente. O reagente FRAP foi utilizado como branco para calibrar o espectrofotômetro.

Para a quantificação da atividade antioxidante foi construída curva de calibração utilizando-se Trolox como padrão, apresentando linearidade entre 0-1600 mM e os resultados foram expressos em TEAC (mM Trolox /mg proteína).

Atividade Quelante do Íon Ferro

A atividade quelante do íon ferro foi determinada por meio da metodologia descrita por Carter (1971), com modificações. Um volume de 50 µL das amostras, em diferentes concentrações (10-100 µg de proteína) foram misturados com 60 µL de solução FeCl₂ (0.01%, w/v) e 180 µL de tampão acetato de sódio (100 mM, pH 4,9). A reação foi iniciada pela adição de 10µL de ferrozina (40 mM) e a incubação feita a temperatura ambiente por 30 min. Foi utilizado EDTA (agente quelante) como controle positivo e a absorbância da mistura foi determinada a 560 nm em espectrofotômetro de microplaca Epoch (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA).

Para expressar os resultados, foi construída curva de calibração utilizando-se diferentes concentrações de EDTA. Os resultados foram expressos em miliequivalentes de EDTA por g de amostra (mEq/g).

Análise Estatística

O trabalho foi conduzido utilizando-se delineamento inteiramente casualizado, sendo todas as análises realizadas em triplicata. Os resultados das análises foram avaliados estatisticamente, por meio da Análise de Variância (ANOVA), aplicando-se o teste de Tukey, ao nível de 5 % de significância. Todos os resultados foram apresentados como média e desvio padrão. Para a análise estatística dos dados, foi utilizado o programa Statistica 10.0 (Stat Soft Inc., Tulsa, Ok, USA).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Métodos de Extração e Quantificação de Proteínas

Sabendo-se que os principais fatores que afetam a solubilidade das proteínas são o pH, a força iônica, a temperatura e a constante dielétrica do solvente (RENDINA, 1971), foram testados cinco métodos de extração diferentes apresentando variações nestes fatores. O perfil eletroforético das frações proteicas extraídas foi analisado utilizando-se condições desnaturantes (SDS-PAGE).

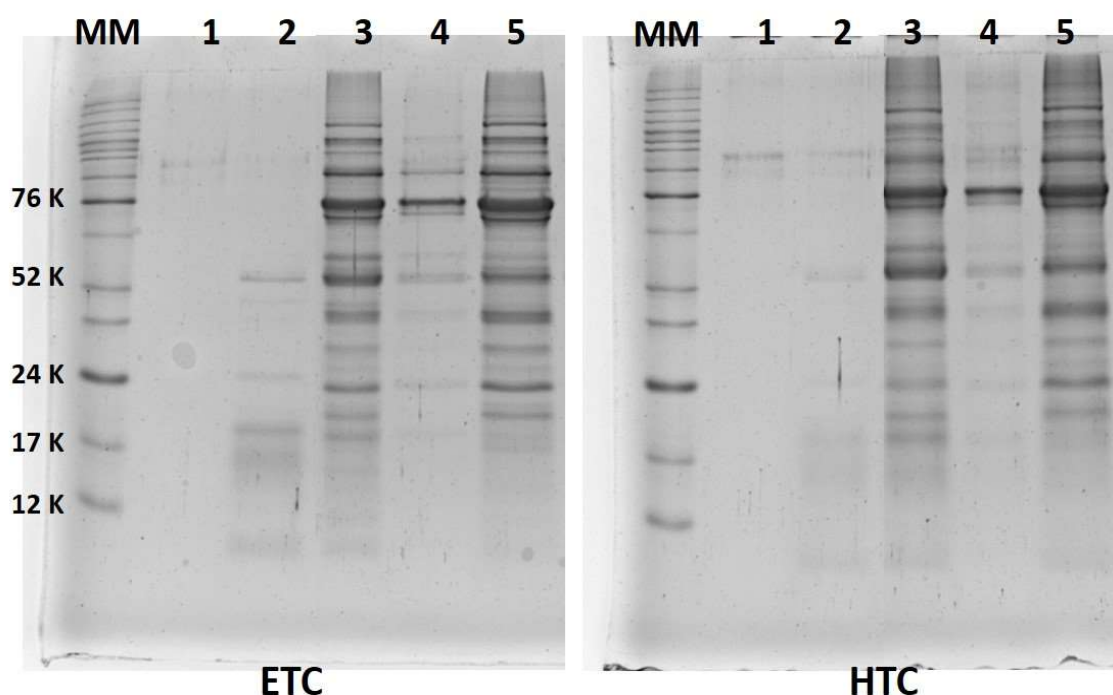


Figura 1. Perfil eletroforético do extratos proteicos de feijão comum ETC e HTC
MM: marcador de massa molecular; 1: Diclorometano/Metanol; 2: Acetonitrila/Água/Ácido fórmico; 3: Acetato de Sódio; 4: Bicarbonato de Amônio; 5: Extração Alcalina

A eletroforese é um método em que proteínas são separadas segundo seu tamanho, sendo útil para a determinação da massa molecular relativa da proteína. No resultado obtido na eletroforese (Figura 1) percebeu-se que o método 2 é mais eficaz na extração de peptídeos. Por outro lado, os métodos 3 e 5 extraem tanto proteínas de alta como de baixa massa molecular. Nesses três métodos observou-se um número maior de bandas com massa molecular igual ou menor que 24 kDa, sendo estes métodos selecionados para a realização dos testes de atividade biológica.

Os feijões são uma importante fonte proteica, apresentando teor de proteínas entre 20 a 25% do peso seco do grão. A fração proteica de feijão é constituída principalmente por faseolinas (em torno de 50%) e lectinas (10-27%). Como pode ser observado na Tabela 1, a solubilidade das proteínas de feijão variou de acordo com o método de extração utilizado, provavelmente

devido às características intrínsecas de cada solvente.

Estes resultados evidenciam que o tipo de extrator é um fator importante que pode afetar não só a quantidade de proteínas extraídas, mas também a natureza das biomoléculas extraídas. Além disso, com exceção do método 2, foi observado uma menor solubilização das proteínas provenientes de feijões endurecidos.

Este resultado pode ser explicado pelo fato de que um dos efeitos mais pronunciados do endurecimento (HTC) se refere à redução da solubilidade proteica em função da formação de complexo entre essas macromoléculas e os demais componentes do grão.

Tabela 1. Conteúdo proteico nos diferentes métodos de extração (mg/g farinha).

Método de Extração	ETC (mg/g de farinha)	HTC (mg/g de farinha)
Método 2	25,6 ± 4,7 ^c	30,4 ± 3,8 ^c
Método 3	154,3 ± 12,6 ^b	106,5 ± 21,2 ^b
Método 5	352,7 ± 76,2 ^a	367,2 ± 22,9 ^a

Resultados expressos em média ± desvio padrão

Letras iguais em uma mesma coluna significam que não houve diferença estatística ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey.

De modo geral, o método de extração 2 (acetronitrila, água e ácido fórmico), por ser um solvente de polaridade média a alta, foi capaz de extrair proteínas, polipeptídeos e peptídeos apresentando diferentes graus de hidrofobicidade, com presença de resíduos carregados em sua superfície. Por outro lado, o método 5 é comumente referido como um método de extração para proteínas totais (CARRASCO-CASTILLA et al., 2012), já que neste método, a maioria das proteínas e peptídeos presentes no extrato se encontram em estado iônico diferente do ponto isoelétrico, e, portanto, solúveis no meio de extração. Considerando-se que o pH do solvente utilizado neste método foi 8,0 foram extraídas todas as proteínas e peptídeos cujo ponto isoelétrico estivesse abaixo deste pH.

Atividade Antioxidante

Substâncias antioxidantes estão naturalmente presentes nos alimentos e são reconhecidas como componentes importantes para promoção e manutenção da saúde. Antioxidantes estão associados a uma ação protetora das células contra danos oxidativos interceptando radicais livres e reduzindo o estresse oxidativo, que ocasionam tanto envelhecimento quanto o desenvolvimento de doenças degenerativas, como doenças cardiovasculares e inflamatórias (LUNA-VITAL et al., 2015; MATSUDA e SHIMOMURA, 2013).

Diferentes ensaios *in vitro* e *in vivo* têm sido utilizados para se determinar a atividade antioxidante em extratos vegetais. A diversidade de ensaios para uma mesma atividade se justifica devido à complexidade química

dos extratos, constituídos por dezenas de compostos antioxidantes com diferentes grupos funcionais, polaridade e comportamento químico (OZTURK, 2012; VALDEZ-ORTIZ et al., 2012). Neste estudo, determinou-se a atividade antioxidante *in vitro* pelo sequestro do radical livre DPPH, que utiliza compostos cromogênicos que estimulam a transferência de elétrons e também pelo ensaio FRAP, caracterizado pela redução do ferro.

O ensaio de atividade antioxidante utilizando DPPH não apresenta seletividade por nenhum composto antioxidante específico, refletindo a capacidade antioxidante geral da amostra. Esse método é frequentemente utilizado no intuito de se fazer uma varredura do potencial antioxidante de diferentes proteínas e peptídeos de plantas (BORAWSKA et al. 2016). Os resultados da atividade sequestrante de DPPH estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Atividade antioxidante pelo sequestro do radical livre DPPH em diferentes extratos proteicos de feijão comum (mM TEAC/g de proteína).

Método de Extração	Amostra	ETC	HTC
Método 2	Extrato Bruto	17,8 ^{ba} ±0,2	15,2 ^{bb} ±0,9
	Fração > 10 kDa	0,0	0,0
	Fração < 10 kDa	22,2 ^{aA} ±0,1	19,1 ^{aB} ±0,2
Método 3	Extrato Bruto	12,4 ^{bb} ±0,6	16,5 ^{ba} ±0,2
	Fração > 10 kDa	1,73 ^{ca} ±0,0	1,85 ^{ca} ±0,0
	Fração < 10 kDa	22,4 ^{aA} ±1,1	22,6 ^{aA} ±0,8
Método 5	Extrato Bruto	11,7 ^{ca} ±0,1	11,8 ^{ba} ±0,1
	Fração > 10 kDa	18,4 ^{ba} ±0,1	16,6 ^{aB} ±0,1
	Fração < 10 kDa	20,9 ^{aA} ±1,0	17,9 ^{aB} ±0,1

Resultados expressos em média ± desvio padrão

Letras maiúsculas iguais em uma mesma linha ou letras minúsculas na mesma coluna significam que não houve diferença estatística ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey.

Conforme pode ser observado na Tabela 2, é possível notar que há diferença entre a atividade antioxidante do extrato bruto para as amostras fracionadas, exceto para o feijão HTC, obtido por extração alcalina, onde observa-se igualdade estatística entre as frações menor e maior que 10kDa. Entretanto, independentemente da presença ou não de efeito HTC, a fração peptídica (< 10kDa) apresentou maior atividade antioxidante.

Nota-se ainda, que ocorre uma redução na atividade antioxidante nas amostras HTC obtidas pela extração pelo método 2, quando comparada aquelas de feijão ETC, fato que pode ser explicado devido ao fenômeno de endurecimento que pode provocar alterações nas propriedades bioquímicas e tecnológicas do conteúdo proteico das amostras. Por outro lado, ao analisar o método 3, a atividade antioxidante não apresentou alterações entre os feijões ETC e HTC, para as frações menor e maior que 10 kDa, observando apenas aumento de atividade no extrato bruto dos feijões HTC (13%).

Em relação ao método 5, observa-se um incremento da atividade antioxidante nas farinhas ETC, ocasionado pelo processo de fracionamento. Os resultados obtidos nos processos de fracionamento foram significativos no âmbito de separar e concentrar os compostos antioxidantes presentes nos extratos e promover o aumento da capacidade antioxidante, conforme verificado na Tabela 2.

Tais resultados podem ser explicados pela considerável concentração de aminoácidos antioxidantes encontrados nestas frações, os quais possuem grande capacidade de doar elétrons ao radical DPPH e estabilizá-lo. (VÁSQUEZ-VILLANUEVA et al., 2016). Enquanto que as amostras que obtiveram menor ação antioxidante, provavelmente devem estar associadas à interação negativa de componentes extraídos ou pela presença de substâncias com menor poder redutor (SONG, et al., 2015).

Além disso, o aumento de atividade antioxidante pode ainda ser atribuído em parte, à síntese de sistemas de defesa incluindo proteínas quando as sementes de feijão estão em condições desfavoráveis, como o fenômeno HTC (VANDENBORRE, SMAGGHE e VAN DAMME, 2011), portanto estas proteínas de defesa, poderiam ter um papel importante no fornecimento de peptídeos e polipeptídeos antioxidantes.

Essas alterações de atividade antioxidante dependendo do extrator ou do tipo de feijão pode estar associada à presença de peptídeos e polipeptídeos de caráter hidrofóbico, uma vez que a literatura correlaciona o aumento da atividade do radical DPPH ou outras atividades de eliminação de radicais com o aumento da hidrofobicidade destas moléculas, pois os aminoácidos e proteínas hidrofóbicos atuam como antioxidantes aumentando a solubilidade dos peptídeos em ambientes não polares, facilitando assim uma melhor interação com radicais livres para terminarem as suas atividades (KIM et al., 2007; POWNALL et al., 2010).

Em relação ao ensaio de FRAP (Tabela 3), observa-se elevada atividade antioxidante para as frações peptídicas (< 10 kDa), sendo até 5,4 vezes superior que a dos extratos brutos.

É importante ressaltar que não foi observado atividade antioxidante no extrato bruto e nem para fração maior 10 kDa, para as proteínas extraídas pelos métodos 3 e 5. Esse fato pode ser explicado devido aos métodos de extração utilizarem solventes polares e altamente hidrofílicos, extraindo, portanto, proteínas totais da amostra e não proteínas de média polaridade, reduzindo a concentração de moléculas com propriedades antioxidantes (MAHATMANTO et al., 2014).

Tabela 3: Atividade antioxidante pela redução do ferro (FRAP) em diferentes extratos proteicos de feijão comum ($\mu\text{mol TEAC/g}$ de proteína).

Método de Extração	Amostra	ETC	HTC
Método 2	Extrato Bruto	11,3 ^{ba} $\pm 0,5$	6,2 ^{bb} $\pm 0,2$
	Fração > 10 kDa	3,7 ^{ca} $\pm 0,2$	3,4 ^{ca} $\pm 0,2$
	Fração < 10 kDa	62,1 ^{aA} $\pm 1,3$	48,1 ^{aB} $\pm 2,6$
Método 3	Extrato Bruto	0,0	0,0
	Fração > 10 kDa	0,0	0,0
	Fração < 10 kDa	51,7 ^{aA} $\pm 1,1$	57,4 ^{aA} $\pm 1,5$
Método 5	Extrato Bruto	0,0	0,0
	Fração > 10 kDa	0,0	0,0
	Fração < 10 kDa	49,0 ^{aA} $\pm 0,6$	44,1 ^{aB} $\pm 1,3$

Resultados expressos em média \pm desvio padrão

Letras maiúsculas iguais em uma mesma linha ou letras minúsculas na mesma coluna significam que não houve diferença estatística ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey

Adicionalmente, o fracionamento por ultrafiltração proporcionou a obtenção de frações peptídicas com elevada capacidade antioxidante, quando comparadas ao extrato bruto. O aumento da concentração de peptídeos e polipeptídeos com resíduos de aminoácidos com cadeias laterais contendo grupos carboxílicos e aminas contribuiria para o aumento a capacidade antioxidante das amostras fracionadas (BAMDAD et al., 2015).

A literatura relata correlação entre atividade antioxidante de peptídeos e polipeptídeos com sua composição de aminoácidos e as suas sequências. De modo geral, a presença dos aminoácidos Leu, Lys, Met, Tyr, Ile, His e Trp, nas matrizes avaliadas provavelmente poderiam ter contribuído para o forte poder de redução observado principalmente nas frações peptídicas (< 10kDa) (NGOH et al., 2016; POWNALL et al., 2010).

Desse modo, os resultados encontrados nos testes de atividade antioxidante (DPPH e FRAP) evidenciam que as amostras apresentam elevada atividade antioxidante. Além disso, a expressiva atividade observada na fração menor que 10 kDa para ambos os feijões, nos dois métodos testados, nos permite inferir que essa atividade é proveniente de polipeptídeos e peptídeos presentes naturalmente nas amostras de feijão. A presença de peptídeos naturais com atividade biológica é um aspecto importante na promoção da saúde e inclusão do feijão nas dietas com vista à remoção de radicais livres e consequente redução de susceptibilidade a doenças relacionadas ao estresse oxidativo, contribuindo enormemente para a promoção da saúde humana.

Atividade Quelante de Ferro

O ferro é um metal de transição envolvido em diversas funções do organismo humano, podendo atuar como cofator enzimático, na síntese de

DNA e proteínas, no transporte de oxigênio, produção de neurotransmissores e divisão celular. Diariamente cerca de 1-2 mg deste mineral são perdidos pelo organismo através da pele, intestino, sangue menstrual e trato urinário, sendo que a deficiência deste pode desencadear doenças como anemia falciforme e distúrbios neurodegenerativos (HAGEMEIERS et al., 2015; PERIGNON et al., 2016). Além desta perda natural, é importante considerarmos também a baixa biodisponibilidade deste elemento, que varia de 5-18%, dependendo da dieta, o que significa que nem todo o teor de ferro encontrado nos alimentos pode ser absorvido pelo organismo, fato explicado principalmente pela baixa solubilidade deste mineral nos fluidos corporais (MIR-MARQUÉS, CERVERA e GUARDIA, 2016).

Sendo assim, a suplementação da dieta com componentes que aumentam a capacidade de absorção de ferro pelo organismo corresponde a uma estratégia interessante do ponto de vista relacionado a saúde pública. Como citado anteriormente, peptídeos bioativos podem possuir capacidade de quelar metais e consequentemente aumentar sua biodisponibilidade, evitando que, ao passar pelo processo de digestão, os íons Fe^{2+} sejam oxidados a sua forma insolúvel Fe^{3+} , que retardam e diminuem a absorção deste mineral (ECKERT et al., 2016). Além disso, moléculas quelantes de íons metálicos também são consideradas importantes por apresentarem atividade antioxidante, uma vez que metais de transição como ferro e cobre podem causar danos oxidativos em diferentes níveis celulares (CANABADY-ROCHELLE et al., 2015). A atividade quelante de metais de peptídeos bioativos se deve a uma combinação de fatores que envolvem o tamanho do peptídeo, resíduos N e C terminais dos aminoácidos e quantidade total de grupos amino e carboxílicos no peptídeo (GUO et al., 2013). Os principais peptídeos associados a atividade quelante de ferro vem demonstrando presença dos aminoácidos His, Glu, Asp, Cys (HOZ et al., 2014; MAESTRI; MARMIROLI e MARMIROLI, 2016; TORRES-FUENTES; ALAIZ e VIOQUE, 2012). Os resultados da atividade quelante de ferro dos extratos proteicos de feijão ETC e HTC estão apresentados na Tabela 4. Como pode ser observado não houve diferença estatística nos valores de atividade quelante entre os extratos brutos dos feijões HTC e ETC extraídos pelo método 3. Entretanto, para os métodos 2 e 5, o comportamento dos extratos brutos foi diferente dependendo do tipo de feijão. Para os extratos obtidos pelo método 2, o feijão HTC apresentou maior atividade quelante enquanto que para os extratos do método 3, a maior atividade quelante foi encontrada nos feijões ETC. Esses resultados estão relacionados com as características bioquímicas das proteínas extraídas em cada um desses métodos, sendo que essas diferenças na qualidade das proteínas solubilizadas está diretamente relacionada com as possíveis alterações ocasionadas durante o desenvolvimento do fenômeno HTC, com solubilização de determinado grupo de proteínas e insolubilização/complexação de outros.

Tabela 4. Atividade quelante de Fe^{2+} em diferentes extratos proteicos de feijão comum (EC50).

Método de Extração	Amostra	ETC (μg de proteína)	HTC (μg de proteína)
Método 2	Extrato Bruto	72,6 ^{ba} \pm 1,1	180,1 ^{aA} \pm 33,6
	Fração > 10 kDa	55,8 ^{aB} \pm 1,6	53,3 ^{aB} \pm 0,1
	Fração < 10 kDa	6,5 ^{aC} \pm 0,1	6,3 ^{aC} \pm 0,1
Método 3	Extrato Bruto	100,1 ^{aA} \pm 8,1	95,9 ^{aB} \pm 3,8
	Fração > 10 kDa	59,3 ^{bB} \pm 0,4	126,8 ^{aA} \pm 1,2
	Fração < 10 kDa	5,8 ^{aC} \pm 0,01	5,4 ^{bC} \pm 0,02
Método 5	Extrato Bruto	112,3 ^{aA} \pm 1,7	102,6 ^{ba} \pm 5,7
	Fração > 10 kDa	79,3 ^{bB} \pm 1,4	102,2 ^{aA} \pm 4,9
	Fração < 10 kDa	6,2 ^{aC} \pm 0,03	5,5 ^{bB} \pm 0,01

Resultados expressos em média \pm desvio padrão

Letras maiúsculas iguais em uma mesma linha ou letras minúsculas na mesma coluna significam que não houve diferença estatística ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey

Além disso, analisando-se os resultados de atividade quelante de ferro das frações obtidas por ultrafiltração, fica evidente que independentemente dos efeitos causados pelo fenômeno HTC, a fração peptídica (< 10 kDa) é a maior responsável pela atividade de quelação de ions Fe^{2+} . Os valores apresentados nestas frações correspondem a resultados promissores pois demonstram que as alterações bioquímicas que ocorrem durante o processo de envelhecimento dos feijões não alteraram sua atividade biológica relacionada a capacidade de quelar Fe^{2+} , podendo ocasionar em alguns casos inclusive o aumento da atividade.

4. CONCLUSÃO

Os resultados apresentados permitiram sugerir que as características do solvente influenciam enormemente na quantidade e qualidade das proteínas extraídas, de modo que a escolha do melhor método de extração dependerá do tipo de proteínas que se deseja solubilizar. Além disso, foi demonstrado que o fenômeno de endurecimento não interfere significativamente com a atividade biológica dos peptídeos nativos de feijão comum, apesar das diferenças na solubilidade proteica.

Além disso, o fato dos feijões endurecidos apresentarem atividade antioxidante e quelante de ferro igual ou superior aos feijões ETC é um

resultado extremamente importante, sobretudo do ponto de vista de agregação de valor a um alimento definido atualmente como resíduo ou subproduto sem nenhum valor agregado e frequentemente descartado ou usado apenas para alimentação animal.

Embora feijões endurecidos apresentem reduzida qualidade textural, o uso de tratamentos alternativos (tais como extrusão e autoclavagem) poderia permitir a re-inclusão destes grãos na alimentação humana não apenas como fonte de nutrientes, mas como um componente nutracêutico, contribuindo para o estado de saúde e bem-estar, reduzindo os riscos de desenvolvimento de doenças relacionadas ao estresse oxidativo.

REFERÊNCIAS

ARIZA-ORTEGA, T. J.; ZENÓN-BRIONES, E. Y.; CASTREJÓN-FLORES, J. L.; YÁÑEZ FERNÁNDEZ, J.; GÓMEZ GÓMEZ, Y. M.; OLIVER-SALVADOR, M. C. Angiotensin I converting enzyme inhibitory, antimicrobial, and antioxidant effect of bioactive peptides obtained from different varieties of common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) with in vivo antihypertensive activity in spontaneously hypertensive rats. **European Journal of Food Research and Technology**, v. 239, p. 785–794, 2014.

BATISTA, K. A., PRUDÊNCIO, S. H., FERNANDES, K. F. Changes in the functional properties and antinutritional factors of extruded hard-to-cook common beans. **Journal Food Science**, v.75, p. 286-290, 2010.

BAMDAD, F.; AHMED, S.; CHEN, L. Specifically designed peptide structures effectively suppressed oxidative reactions in chemical and cellular systems. **Journal Functional Foods**, v. 18, p. 35-46, 2015.

BENZIE, I. F. F.; STRAIN, J. J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: The FRAP assay. **Analytical Biochemistry**, v. 239, n. 1, p. 70-76, 1996.

BETANCUR-ANCONA, D.; SOSA-ESPINOZA, T.; RUIZ-RUIZ, J.; SEGURA-CAMPOS, M.; CHELGUERRERO, L. Enzymatic hydrolysis of hard-to-cook bean (*Phaseolus vulgaris* L.) protein concentrates and its effects on biological and functional properties. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 49, p. 2–8, 2014.

BORAWSKA, J. DAREWICZ, M; VEGARUD, G. E.; MINKIEWICS, P. Antioxidant properties of carp (*Cyprinus carpio* L.) protein *ex vivo* and *in vitro* hydrolysates. **Food Chemistry**, v. 194, p. 770-779, 2016.

BRAND-WILIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Food Science and Technology**, v. 28, p. 25-30, 1995.

CÂMARA, C. R. S.; URREA, C. A.; SCHLEGEL, V. Pinto beans (*Phaseolus vulgaris* L.) as a functional food: Implications on human health. **Agriculture**, v. 3, p. 90–111, 2013.

CANABADY-ROCHELLE, L. L. S.; HARSCOAT-SCHIAVO, C.; KESSLER, V.; AYMES, A.; FOURNIER, F.; GIRARDET, J. M. Determination of reducing power and metal chelating ability of antioxidant peptides: revisited methods. **Food Chemistry**, England, v. 183, p. 129-135, 2015.

CARRASCO-CASTILLA, J.; HERNÁNDEZ-ÁLVAREZ, A.J.; JIMÉNEZ-MARTÍNEZ, C.; JACINTO-HERNÁNDEZ, C.; ALAIZ, M.; GIRÓN-CALLE, J.; VIOQUE, J.; DÁVILA-ORTIZ, G. Antioxidant and metal chelating activities of *Phaseolus vulgaris* L. var. Jamapa protein isolates, phaseolin and lectin hydrolysates. **Food Chemistry**, v. 131, p. 1157–1164, 2012.

CARTER, P. Spectrophotometric Determination of Serum Iron at the Submicrogram Level with a New Reagent (Ferrozine). **Analytical Biochemistry**, v. 40, p. 450- 458, 1971.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (CONAB). Acompanhamento da Safra Brasileira de Grãos 2013/2014- Terceiro Levantamento. 2013. Disponível em:

http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/16_01_12_09_00_46_bol_etim_graos_janeiro_2016.pdf

Acesso em: 26/01/2017.

ECKERT, E.; LU, L.; UNSWORTH, L. D. CHEN, L.; XIE, J.; XU, R. Biophysical and in vitro absorption studies of iron chelating peptide from barley proteins. **Journal of Functional Foods**, v. 25, p. 291-301, 2016.

GUO, L.; HOU, H.; LI, B.; ZHANG, Z.; WANG, S.; ZHAO, X. Preparation, isolation and identification of iron-chelating peptides derived from Alaska pollock skin. **Process Biochemistry**, v. 48, p. 988-993, 2013.

HAGEMEIER, J.; TONG, O.; DWYER, M. G.; SCHWESER, F.; RAMANATHAN, M.; ZIVADINOV, R. Effects of diet on brain iron levels among healthy individuals: an MRI pilot study. **Neurobiology of Aging**, v. 36, p. 1678-1685, 2015.

HARTMANN R., MEISEL H. Food–derived peptides with biological activity: from research to food applications. **Current Opinion in Biotechnology**. v.18,

p.163–169, 2007.

HOZ, L. L.; PONEZI, A. N.; MILANI, R. F.; SILVA, V. S. N.; SOUZA, S.; BERTOLO-PACHECO, M. T. Iron-binding properties of sugar cane yeast peptides. **Food Chemistry**, v. 142, p. 166-169, 2014.

KIM, H. J.; BAE, I. Y.; AHN, C-W.; LEE, S.; LEE, H. G. Purification and identification of adipogenesis inhibitory peptide from black soybean protein hydrolysate. **Peptides**. v. 28, p. 2098- 2103, 2007.

KITTS, D.D.; WEILER, K. Bioactive proteins and peptides from food sources. Applications of bioprocesses used in isolation and recovery. **Current Pharmaceutical Design**, v. 9, p.1309–1323, 2003.

KORHONEN, H.; PIHLANTO, A. Bioactive peptides: Production and functionality. **International Dairy Journal**, v. 16, p. 945–960, 2006.

LEMES, A.C.; SALA, L.; ORES, J.C.; BRAGA, A.R.C.; EGEA, M.B.; FERNANDES, K.F. **A Review of the Latest Advances in Encrypted Bioactive Peptides from Protein-Rich Waste**. **International Journal of Molecular Sciences**. v. 17, p. 950, 2016.

LIMA, R. A.Z. 2013. Armazenamento de feijão: uso da embalagem a vácuo na manutenção da qualidade. **Tese de Doutorado**. Universidade Federal de Lavras, Lavras, 107p.

LOPES, L.C.M.; BATISTA, K.A.; FERNANDES, K.F.; SANTIAGO, R.A.C. Functional, biochemical and pasting properties of extruded bean (*Phaseolus vulgaris*) cotyledons. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 47, p. 1859-1865, 2012.

LUNA-VITAL, D.A.; MEIJÍA, E.G.; MENDOZA, S.; LOARCA-PIÑA, G. Peptides present in the non-digestible fraction of common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) inhibit the angiotensin-I converting enzyme by interacting with its catalytic cavity independent of their antioxidant capacity. **Food Function**, v. 6, p. 1470-1470, 2015.

MAESTRI, E.; MARMIROLI, M.; MARMIROLI, N. Bioactive peptides in plant-derived foodstuffs. **Journal of Proteomics**, v. 147, p. 140-155, 2016.

MAHATMANTO, T; POTH, A. G; MYLNE, J. S; CRAIK, D. J. A comparative study of extraction methods reveals preferred solvents for cystine knot peptide isolation from *Momordica cochinchinensis* seeds. **Fitoterapia**, v. 95, p. 22–33, 2014.

MARAHIEL, M.A.; STACHELHAUS, T.; MOOTZ, H.D. Modular peptide synthetases involved in nonribosomal peptide synthesis. **Chemical Reviews**. v. 97, p. 2651–2674. 1997

MARQUES, M. R.; FONTANARI, G. G.; PIMENTA, D. C.; SOARES-FREITAS, R. M.; ARÊAS, J. A. G. Proteolytic hydrolysis of cowpea proteins is able to release peptides with hypocholesterolemic activity. **Food Research International**, v. 77, p. 43-48, 2015.

MATSUDA, M.; SHIMOMURA, I. Increased oxidative stress in obesity: Implications for metabolic syndrome, diabetes, hypertension, dyslipidemia, atherosclerosis, and cancer. **Obesity Research and Clinical Practice**, v. 7, p. 330-341, 2013.

MIR-MARQUÉS, A.; CERVERA, M. L.; GUARDIA, M. Mineral analysis of human diets by spectrometry methods. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 82, p. 457-467, 2016.

NGOH, YING-YUAN.; GAN, CHEE-YUEN. Enzyme-assisted extraction and identification of antioxidative and α -amylase inhibitory peptides from Pinto beans (*Phaseolus vulgaris* cv. Pinto). **Food Chemistry**. v. 190, p. 331–337, 2016.

OSEGUERA-TOLEDO, M. E.; MEJÍA, E. G.; AMAYA-LLANO, S. L. Hard-to-cook bean (*Phaseolus vulgaris* L.) proteins hydrolyzed by alcalase and bromelain produced bioactive peptide fractions that inhibit targets of type-2 diabetes and oxidative stress. **Food Research International**, v. 76, p. 839-851, 2015.

OZTÜRK, M. Anticholinesterase and antioxidant activities of Savoury (*Satureja thymbra* L.) with identified major terpenes of the essential oil. **Food Chemistry**. v. 134, p. 48–54, 2012.

PERIGNON, M.; BARRÉ, T.; GAZAN, R.; AMIOT, M. J.; DARMON, N. The bioavailability of iron, zinc, protein and vitamin A is highly variable in French individual diets: Impact on nutrient inadequacy assessment and relation with the animal-to-plant ratio of diets. **Food Chemistry**, v. X, p. xxx-xxx, 2017.

POWNALL, T.L., UDENIGWE, C.C. AND ALUKO, R.E. Amino acid composition and antioxidant properties of pea seed (*Pisum sativum* L.) enzymatic protein hydrolysate fractions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 4712-4718, 2010.

RICHETTI, A.; MELO, C. L. P.; SOUSA, J. P. B. **Viabilidade econômica da cultura do feijão comum, safra 2012, em Mato Grosso do Sul**. Embrapa comunicado técnico, 173. Dourados, MS, 2011. 9 p.

RIZELLO, C. G.; TAGLIAZUCCHI, D.; BABINI, E.; RUTELLA, G. S.; SAA, D. L. T.; GIANOTTI, A. Bioactive peptides from vegetable food matrices: research trends and novel biotechnologies for synthesis and recovery. *Journal of Functional Foods*, v. 27, p. 549-569, 2016.

ROCHA, T. S.; HERNANDEZ, L. M. R.; CHANG, Y. K.; MEJÍA, E. G. Impact of germination and enzymatic hydrolysis of cowpea bean (*Vigna unguiculata*) on the generation of peptides capable of inhibiting dipeptidyl peptidase IV. *Food Research International*, v. 64, p. 799-809, 2014.

RUIZ-RUIZ, J. C.; CAMPOS, M. R. S.; ANCONA, D. A. B.; GUERRERO, L. A. C. Encapsulation of *Phaseolus lunatus* protein hydrolysate with angiotensin-converting enzyme inhibitory activity. *Biotechnonology*, v. 2013, p. 1-6, 2013.

SIQUEIRA, BEATRIZ S.; PEREIRA, WENDELL J.; BATISTA, KARLA A.; OOMAH, B. DAVE; FERNANDES, KÁTIA F.; BASSINELLO, PRISCILA ZACZUK. Influence of Storage on Darkening and Hardening of Slow- and Regular-Darkening Carioca Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Genotypes. *Journal of Agricultural Studies*, v. 2, p. 87-104, 2014.

SONG, R.; WEI, R.B.; RUAN, G.Q.; LUO, H.Y. Isolation and identification of antioxidant peptides from peptic hydrolysates of half-fin anchovy (*Setipinna taty*). *LWT- Food Science Technology*. V. 60, p. 221-229, 2015.

SU, M. Y.; BROADHURST, M.; LIU, C. P.; GATHERCOLE, J.; CHENG, W. L.; QI, X Y.; CLERENS, S.; DYER, J. M.; DAY, L.; HAIGH, B. Comparative analysis of human milk and infant formula derived peptides following in vitro digestion. *Food Chemistry*, v. 221, p. 1895-1903, 2016.

VALDEZ-ORTIZ, A.; FUENTES-GUTIÉRREZ, C.I.; GERMÁN-BÁEZ, L.J.; GUTIÉRREZ-DORADO, R.; MEDINA-GODOY, S. Protein hydrolysates obtained from Azufrado (sulphur yellow) beans (*Phaseolus vulgaris*): Nutritional, ACE-inhibitory and antioxidative characterization. *LWT - Food Science and Technology*, v. 46, p. 91-96, 2012.

VANDENBORRE, G.; SMAGGHE, G.; VAN DAMME, E. J. M. Plant lectins as defense proteins against phytophagous insects. *Phytochemistry*, v. 72, p. 1538 -1550, 2011.

VÁSQUEZ-VILLANUEVA, R.; MARINA, M.L.M.; GARCIA, C. Identification by hydrophilic interaction and reversed-phase liquid chromatography-tandem mass spectrometry of peptides with antioxidant capacity in food residues. **Journal of Chromatography A**. v. 1428, p. 185-192, 2016.

ZHAO, Y.; DU, S.; WANG, H.; CAI, M. In vitro antioxidant activity of extracts from common legumes. **Food Chemistry**, v. 152, p. 462-466, 2014.